

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 31 日 (31.12.2003)

PCT

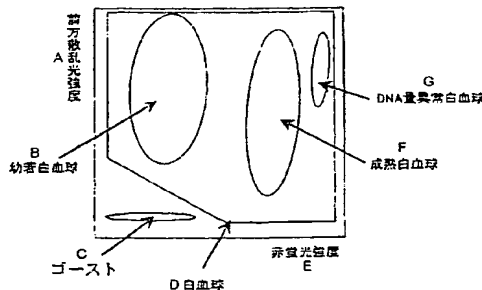
(10) 国際公開番号  
WO 2004/001408 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/49, 15/14, 21/64, 21/78 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007910 (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 辻 智悠  
(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 23 日 (23.06.2003) (TSUJI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市  
(25) 国際出願の言語: 日本語 中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式  
(26) 国際公開の言語: 日本語 会社内 Hyogo (JP). 水上 利洋 (MIZUKAMI, Toshihiro)  
(30) 優先権データ: 特願 2002-183259 2002 年 6 月 24 日 (24.06.2002) JP [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).  
小西 綾 (KONISHI, Aya) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).  
森 悠丞 (MORI, Yusuke) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).  
中澤 幸恵 (NAKAZAWA, Yukie) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CLASSIFYING AND COUNTING LEUCOCYTES

(54) 発明の名称: 白血球の分類計数方法



A...FORWARD SCATTERING LIGHT INTENSITY  
B...IMMATURE LEUCOCYTE  
C...GHOST  
D...LEUCOCYTE  
E...RED-FLUORESCENT INTENSITY  
F...MATURE LEUCOCYTE  
G...LEUCOCYTE WITH ABNORMAL DNA CONTENT

(57) Abstract: A method of classifying and counting leucocytes with abnormal DNA content which comprises: (1) the step of treating a hematological sample with a hemolytic agent and staining cells in the thus hemolyzed sample with a fluorescent dye capable of showing a difference in fluorescent intensities of at least matured leucocytes, leucocytes with abnormal DNA content and immature leucocytes; (2) the step of introducing the sample containing the stained cells into a flow cytometer and measuring the scattering light and the fluorescence of each cell; (3) the step of separating leucocytes from aggregated platelets and simultaneously passing cells with the use of a difference in scattering light peaks and a difference in scattering light widths; and (4) classifying the leucocytes separated in the step (3) into mature leucocytes, leucocytes with abnormal DNA content and immature leucocytes with the use of a difference in scattering light intensities and a difference in fluorescent intensities of the cells followed by counting.

(57) 要約: (1) 血液学的試料を溶血剤と処理して赤血球を溶解させて得られた試料中の細胞を、少なくとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、  
(2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各細胞について、

[続葉有]

WO 2004/001408 A1

WO 2004/001408 A1



(74) 代理人: 野河 信太郎 (NOGAWA, Shintaro); 〒530-0047  
大阪府 大阪市北区 西天満 5 丁目 1-3 南森町パーク  
ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

散乱光と、蛍光とを測定する工程、(3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、血小板凝集および同  
時通過細胞と、白血球とを分類する工程、(4) 工程 (3) で分類された白血球について細胞の散乱光の強度差と  
蛍光の強度差とを利用して、成熟白血球、DNA 量異常白血球および幼若白血球を分類計数する工程からなる DNA  
量異常白血球の分類計数方法により提供される。

## 明細書

## 白血球の分類計数方法

## 技術分野

- 5      本発明は白血球の分類計数方法に関する。より詳細には、フローサイ  
トメータを利用した血液学的試料の白血球、ことに DNA 量異常白血球の  
分類計数方法に関する。

## 背景技術

- 10      臨床検査の分野において、DNA 量異常白血球や幼若白血球の分類計数  
を行うことにより、疾患の診断を行う上で極めて有用な情報を得ることが  
できる。例えば、通常、正常な末梢血中の白血球には、リンパ球、単球、  
好塩基球、好酸球、好中球の 5 つが存在し、その DNA 量は一定である。  
しかし、例えば、ウィルス疾患やリンパ系白血病などの血液疾患では DNA  
15      量異常白血球が出現し、骨髓系白血病などの血液疾患では幼若白血球が  
出現する。

- 従来、DNA 量異常白血球を測定するには、比重遠心分離により白血球か  
ら分離した単核球（リンパ球および単球）または末梢血などと核酸染色  
色素と溶血剤とを混合して染色した後に、測定する必要があった。比重  
20      遠心分離による単核球分離は、操作が煩雑であるため、分離が完了する  
までに 1 時間以上要する。さらに単核球または末梢血を核酸染色色素お  
よび溶血剤と混合し染色するのに 30 分以上要する。

また幼若白血球を分類計数するには、血液の塗抹標本を作製し、適当な染色を施した後に顕微鏡で観察しながら、分類計数するのが一般的であった。一方、近年、フローサイトメータの原理を応用した種々の全自動血球分類計数装置が提供されている。しかしながら、これらの装置は、

5 正常な白血球を高精度に分類計数することができるが、血小板凝集や同時通過細胞などの影響を大きく受け、幼若白血球を確実に検出し、分類することはできなかった。

一方、幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で処理した後に、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で

10 染色し、得られた血球の散乱光と蛍光を測定することにより、幼若白血球と正常白血球を同時に、分類計数できることが報告されている（特開平10-206423号）。しかしこの方法では、DNA量異常白血球と血小板凝集および同時通過細胞を分別することができず、DNA量異常白血球を正確に分類計数することができなかった。

15 したがって、DNA量異常白血球、さらに同時に幼若白血球を測定するための迅速、簡便かつ高精度に測定可能な方法が望まれている。

#### 発明の開示

本発明によれば、幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球

20 に損傷を与える溶血剤で処理した後に、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色し、得られた血球の散乱光と蛍光を測定し、散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を用いることにより、DNA量異常白血球、

WO 2004/001408

PCT/JP2003/007910

さらに同時に幼若白血球および成熟白血球を分類計数することが可能な方法を提供する。

従って、本発明によれば、

- (1) 血液学的試料を溶血剤で処理して得られた試料中の細胞を、少な  
5 くとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、
  - (2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各細胞について、散乱光と、蛍光とを測定する工程、
  - (3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、同時通過細胞  
10 および血小板凝集と、白血球とを分類する工程、
  - (4) 工程(3)で分類された白血球について散乱光の強度差と蛍光の強度差を利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球を分類計数する工程
- からなる白血球の分類計数方法が提供される。

15

本発明でいう血液学的試料は、末梢血液、骨髓穿刺液、尿等で採取した試料など、白血球を含む体液試料をいう。

本発明でいう成熟白血球とは、成熟したリンパ球、単球、顆粒球のことをいう。

- 20 DNA量異常白血球とは、通常のDNA量より多い、または少ないDNA量をもった白血球のことをいう。ただし、本発明においては、DNA量異常白血球とは、通常のDNA量より多いDNA量をもった白血球

のことを指す。

本発明でいう幼若白血球とは、通常骨髓に存在し、末梢血に出現しない未成熟な白血球をいう。例えば、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球などをいう。前骨髓球、骨髓球、後骨髓球については、まとめて顆粒球系幼若球とすることもある。さらには、芽球以前の分化段階の細胞である、骨髓系幹細胞（CFU-GEMN）、好中球・マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）、好酸球コロニー形成細胞（CFU-EOS）等の白血球系の造血前駆細胞も本発明の幼若白血球の範囲に含む。

10 本発明でいう血小板凝集とは、血小板が2個以上凝集したものをいう。

本発明でいう同時通過細胞とは、2個以上の細胞がほぼ同時にフローセルの検出域を通過し、1つの細胞として計数される状態をいう。

本発明でいう散乱光ピークとは、散乱光から得られる信号波形のピークであり、散乱光幅とは、散乱光から得られる信号波形の幅をいう。

15 本発明では、血液学的試料を溶血剤で処理し、赤血球を溶解させる。一方、この処理により、幼若球白血球は溶解も損傷もせず、成熟白血球及びDNA量異常白血球は損傷される。特定の組成の溶血剤を細胞に作用させた場合、作用機序は明確ではないが、特定の細胞の細胞膜脂質構成成分の一部を抽出（引き抜く）することにより、細胞膜に特定の物質が  
20 通過できるだけの細孔をあける。これを損傷と呼ぶ。この結果、特定の細胞内に色素分子が入り込み染色することができる。従って、損傷を与えられた成熟白血球およびDNA量異常白血球は、染色に好適な状態で

ある。一方、損傷を受けない幼若白血球は、色素の透過を可能とするだけの細孔があけられないために、色素で染色されない。さらに成熟白血球及びDNA量異常白血球は、細胞に含まれるDNA量によって色素の結合量が異なっている。従って、そのような細胞を色素で染色すると、

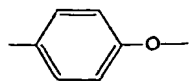
- 5 DNA量に応じて染色される色素の量が異なり、染色された細胞の蛍光強度が異なる。例えば、DNA量が成熟白血球の2倍量のDNA量異常白血球の場合、結合する色素の量は正常な成熟白血球の2倍となり、この細胞は成熟白血球より強い蛍光を発する。この結果、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異が生じる。

- 10 本発明の工程(1)で用いる溶血剤は、界面活性剤、可溶化剤、アミノ酸および緩衝液とからなるのが好ましい。

界面活性剤としては種々のものを使用できるが、ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が好ましい。具体的には、以下の式(I I)：



- 15 (式中、 $R^{III}$ は $C_{9-25}$ のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；  
 $R^{2II}$ は、 $-O-$ 、



または $-COO-$ ； $n_{II}$ は10～40である。)を有するものを用いることができる。

- 20  $C_{9-25}$ のアルキル基としては、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、

トリデシル、テトラデシル等が挙げられる。 $C_{9-25}$ のアルケニル基としては、ドデセニル、テトラデセニル等が挙げられる。 $C_{9-25}$ のアルキニル基としては、ドデシニル、ウンデシニル、ドデシニル等が挙げられる。

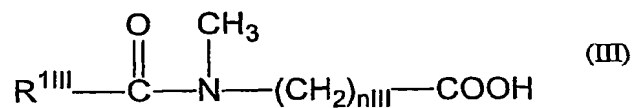
さらに具体的には、ポリオキシエチレン (20) ラウリルエーテル、  
5 ポリオキシエチレン (15) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (1  
6) オレイルエーテルが好適である。

界面活性剤は水溶液の形態で用いることができる。例えばポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤の水中濃度については、使用する界面活性剤の種類によって異なるが、前述のポリオキシエチレン (20) ラ  
10 ウリルエーテルでは、0.1～2.0 g/l (好ましくは0.5～  
1.5 g/l)、ポリオキシエチレン (15) オレイルエーテルでは、  
1～9 g/l (好ましくは3～7 g/l)、ポリオキシエチレン (16)  
オレイルエーテルでは、5～50 g/l (好ましくは15～35 g/l)  
の範囲で使用できる。ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤は、  
15 疎水性基の炭素数が同じであれば、 $n^H$ の数が小さくなるほど細胞を損傷  
する力が強く、 $n^H$ が大きくなるほど弱くなる。また、 $n^H$ の数が同じで  
あれば、疎水性基の炭素数が小さくなるにつれて細胞を損傷する力が強  
くなる。その点を考慮し、上記の値を目安にして、必要な界面活性剤濃  
度は実験により簡単に求めることができる。

20 可溶化剤は、血球の細胞膜に損傷を与え、縮小化するために用いる。  
具体的には、以下：



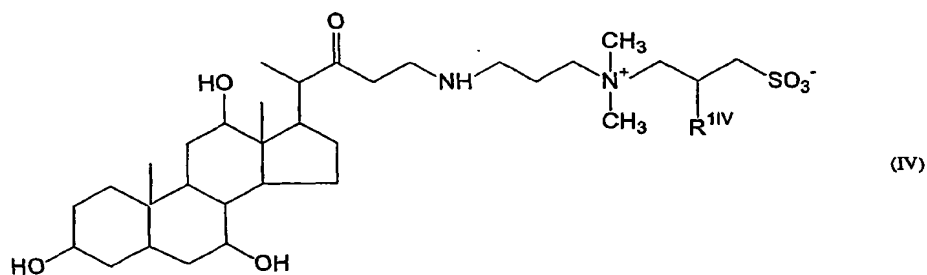
式 (I I I) :



(式中、 $\text{R}^{\text{III}}$ は $\text{C}_{10-22}$ のアルキル基； $n^{\text{III}}$ は1～5である。)

のサルコシン誘導体あるいはその塩、

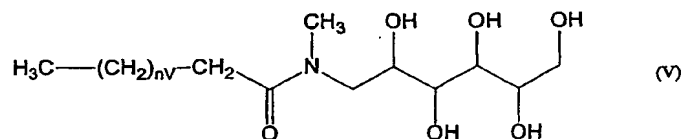
5 式 (I V) :



(式中、 $\text{R}^{\text{IV}}$ は水素原子または水酸基。)

のコール酸誘導体、および

10 式 (V) :



(式中、 $n^{\text{V}}$ は5～7である。)

メチルグルカンアミドから選択される1またはそれ以上を用いることができる。

15  $\text{C}_{10-22}$ のアルキル基としては、デシル、ドデシル、テトラデシル、オレイル等が挙げられる。

具体的には、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ラウロイルメ  
チルβ-アラニンナトリウム、ラウロイルサルコシン、CHAPS (3-  
[ (3-コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ ] -1-プロパン  
スルホネート)、CHAPSO ( [ (3-コールアミドプロピル) ジメ  
5 チルアンモニオ ] -2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート)、  
MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA9 (ノ  
ナノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA10 (デカノイル-N  
-メチルグルカミド) 等が好適に使用できる。

可溶化剤の濃度は、サルコシン酸誘導体あるいはその塩では、0.2  
10 ~2.0 g/L、コール酸誘導体では、0.1~0.5 g/L、メチル  
グルカンアミドでは、1.0~8.0 g/Lが好ましい。

その他に、可溶化剤としては、n-オクチルβ-グルコシド、シューク  
ロースモノカプレートやN-ホルミルメチルロイシルアラニン等が使用  
でき、0.01~50.0 g/Lの濃度で用いるのが好ましい。

15 また、アミノ酸は、幼若白血球の細胞質および細胞膜を固定化するた  
めに用いる。例えば、タンパク質を構成するアミノ酸を使用でき、グル  
タミン酸、バリンや、特にメチオニン、シスチン及びシステイン等のよ  
うな含硫アミノ酸が好適であり、メチオニンが最も好適である。アミノ  
酸は、1~50 g/lの範囲で使用でき、グルタミン酸の場合は8~  
20 12 g/lが好適であり、メチオニンの場合には、16~24 g/lが  
好適である。

緩衝液は、HEPES等のGood緩衝液やリン酸緩衝液等に水酸化

ナトリウム等のようなpH調整剤を加え、必要があれば、塩化ナトリウムのような浸透圧調整剤をさらに加え、pHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/kgとするのが好ましい。

- 本発明の溶血剤としては、(1) ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤；(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤；(3) アミノ酸；および(4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/kgにする緩衝液、電気伝導度を6.0～9.0mS/cmにするための緩衝液からなる、特開平6-273413号に記載の溶血剤が好ましい。

- 10 本発明の成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素は、損傷を与えた細胞または幼若白血球のうちいずれか一方を染色できるものであればよい。損傷を与えた細胞を染色する色素が好ましい。このような蛍光色素は、試料中の血球を含む細胞すべてを染色することができる。

- 15 損傷を与えた細胞を染色する色素とは、細胞核、特にDNAに対して特異性を有する色素あるいはRNAに特異性を有する色素が挙げられる。この目的には、いくつかのカチオン性色素が好適である。

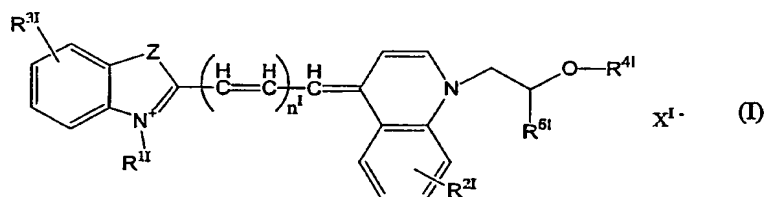
一般的にカチオン性色素は、生きた細胞の細胞膜を通過し、細胞内構成成分を染色する。しかしながら、特定のカチオン性色素（例えば、エ

- 20 チジウムブロマイド、プロピジウムアイオダイド等）は、生細胞を通過せず、損傷細胞のみを染色することがよく知られている。

蛍光色素は、具体的には、前述のエチジウムブロマイド、プロピジウ

ムアイオダイド、さらにモレキュラープローブ社より販売されているエチジウム-アクリジンヘテロダイマー、エチジウムアジド、エチジウムホモダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウムモノアジド、TOTO-1、TO-PRO-1、TOTO-3、

- 5 TO-PRO-3等が挙げられる。さらに光源としてHe-Ne、赤色半導体レーザを使用する場合に好適な色素として、式(I)：



- (式中、 $R^{11}$ は水素原子または低級アルキル基； $R^{21}$ 及び $R^{31}$ は水素原子、低級アルキル基または低級アルコキシ基； $R^{41}$ は水素原子、アシル基または低級アルキル基； $R^{51}$ は水素原子または置換されてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子または低級アルキル基で置換された炭素原子； $n^1$ は1または2； $X^{1-}$ はアニオンである。)で示される色素が使用できる。
- 10

- 上記構造式の $R^{11}$ における低級アルキル基は、 $C_{1-6}$ の直鎖または分岐のアルキル基を意味し、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル基が挙げられ、中でもメチル基、エチル基が好ましい。
- 15

$R^{21}$ 及び $R^{31}$ における低級アルキル基は上記と同様であり、低級アルコキシ基としては、 $C_{1-6}$ のアルコキシ基を意味し、例えばメトキシ、エト

キシ、プロポキシ等が挙げられ、中でもメトキシ基、エトキシ基が好ましい。

$R^{41}$ におけるアシル基は、脂肪族カルボン酸から誘導されたアシル基が好ましく、例えば、アセチル、プロピオニル等が挙げられ、中でもアセ

5 チル基が好ましい。また、低級アルキル基は上記と同様である。

$R^{51}$ における低級アルキル基は上記と同様であり、置換されてもよい低級アルキル基とは、1～3個の水酸基、ハロゲン原子（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素）等で置換されてもよい低級アルキル基を意味し、中でも1個の水酸基で置換されたメチル基、エチル基が好ましい。

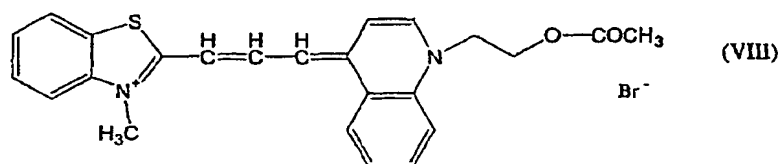
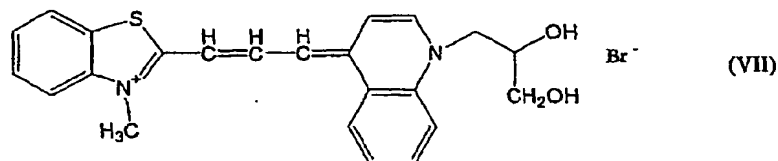
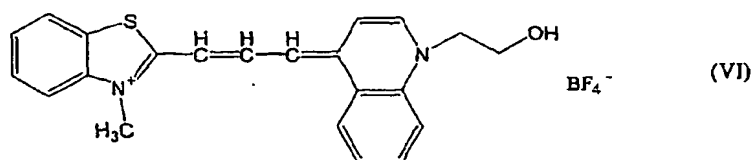
10 Zにおける低級アルキル基とは上記と同様であり、Zとしては硫黄原子が好ましい。

$X^{1-}$ におけるアニオンは、ハロゲンイオン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素イオン）、ハロゲン化ホウ素イオン（ $BF_4^-$ 、 $BCl_4^-$ 、 $BBr_4^-$ 等）、リン化合物イオン、ハロゲン酸素酸イオン、フルオロ硫酸イオン、

15 メチル硫酸イオン、芳香環にハロゲンあるいはハロゲンをもつアルキル基を置換基として有するテトラフェニルホウ素化合物イオン等が挙げられる。中でも臭素イオンまたは $BF_4^-$ が好ましい。

上記色素としては単独または2以上を組み合わせ用いることができる。上記色素の具体的な例としては、好ましくは以下のような色素が挙

20 げられるが、これにより本発明が制限されるものではない。



工程 (I) の好ましい態様は、溶血剤と蛍光色素を含む溶液と血液学  
 5 的試料を混合するものである。あるいは、蛍光色素をエチレングリコール等の水溶性有機溶媒に溶解しておき、使用時に溶血剤と混合してもよい。この場合、色素の保存安定性を高めることができるので好ましい。色素濃度は、使用する色素に応じて適宜決定できる。例えば、エチジウムブロマイドの場合、0.01~100mg/l、好ましくは、0.1  
 10 ~30mg/l が使用できる。

血液学的試料と蛍光色素を含む溶血剤の混合は、血液学的試料と、蛍光色素を含む溶血剤の比が1:10~1:1000、反応温度が20~40℃、反応時間が5秒~5分間で好適に実施できる。反応温度が高いときは反応時間を短くすることが好ましい。本発明において、幼若白血

球を含む試料の DNA 量を測定するには、幼若白血球を染色するために反応時間を長くすることにより可能となる。その場合の反応時間は、例えば 10 秒～5 分間程度の反応時間を用いるのが好ましい。

工程 (2) において、このようにして調製した測定用試料をフローサイトメータに導入し、試料中の染色された細胞のそれぞれについて、散乱光と蛍光を測定する。

図 18 は、本発明に使用できるフローサイトメータの光学系を示す斜視図である。同図においてレーザ 21 から出射されたビームはコリメートレンズ 22 を介してシースフローセル 23 のオリフィス部を照射する。

10 オリフィス部を通過する血球から発せられる前方散乱光は集光レンズ 24 とピンホール板 25 を介してフォトダイオード 26 に入射する。

一方、オリフィス部を通過する血球から発せられる側方散乱光と側方蛍光については、側方散乱光は集光レンズ 27 とダイクロイックミラー 28 とを介してフォトマルチプライアチューブ (以下、フォトマルという) 29 に入射し、側方蛍光は集光レンズ 27 とダイクロイックミラー 28 とフィルター 29 とピンホール板 30 を介してフォトマル 31 に入射する。

15

フォトダイオード 26 から出力される前方散乱光信号と、フォトマル 29 から出力される側方散乱光信号と、フォトマル 31 から出力される側方蛍光信号とは、それぞれアンプ 32、33、34 により増幅され、解析部 35 に入力される。

20

本発明でいう散乱光は、一般に市販されるフローサイトメータで測定

できる散乱光を指し、前方低角散乱光（受光角度の例として、0～5度未満）、前方高角散乱光（受光角度の例として、5～20度付近）、側方散乱光等をいい、好ましくは前方低角散乱光およびさらなる散乱光には側方散乱光が選ばれる。側方散乱光は細胞の核形態などのような内部

5 情報を反映する。

蛍光とは、使用する色素によって好適な受光波長が選択される。蛍光信号は、細胞化学的特性を反映するものである。

フローサイトメータの光源は、特に限定されず、色素の励起に好適な波長の光源が選ばれる。例えば、アルゴンレーザ、He-Neレーザ、

- 10 赤色半導体レーザ、青色半導体レーザなどが使用される。特に半導体レーザは気体レーザに比べて非常に安価であり、装置コストを大幅に下げることができる。

工程（3）において、散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を用いて、血小板凝集および同時通過細胞と、白血球とを分類する。具体的には、

- 15 例えば、X軸に前方散乱光幅、Y軸に前方散乱光ピークをとってスキャッタグラムを作成する。スキャッタグラム中、例えば図1に示すように、血小板凝集および同時通過細胞、ならびに白血球およびゴーストが集団を形成して分布する。このスキャッタグラムのすべての細胞から血小板凝集および同時通過細胞を除いて、血小板凝集および同時通過細胞と、
- 20 白血球およびゴーストとを分類する。この操作により、血小板凝集および同時通過細胞がDNA量異常白血球の領域に出現することが防止され、DNA量異常白血球を正確に分類計数することが可能になる。



次に、工程（４）において、工程（３）で分類された成分の散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球に分類計数する。具体的には、例えば、X軸に蛍光強度、Y軸に前方散乱光強度をとって、上述の血小板凝集および同時通過細胞を除いた血球成分の集団のみでスキッタグラムを作成する。スキッタグラム中、例えば、図２に示すように、成熟白血球、DNA量異常細胞および幼若白血球の各集団と赤血球ゴーストが集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分類計数する。このようにして、成熟白血球数、幼若白血球数およびDNA量異常白血球数を得ることができる。

さらに、工程（５）において、DNA量異常白血球数と成熟白血球数または幼若白血球数とから、DNA量異常白血球に対する成熟白血球または幼若白血球の割合を算出する。

さらに、工程（６）において、成熟白血球数と幼若白血球数とから、成熟白血球に対する幼若白血球の割合を算出する。

さらに、工程（７）において、工程（２）で異なる種類の散乱光をさらに測定し、工程（４）で得られた成熟白血球についての該散乱光と蛍光の強度差を用いてスキッタグラムを作成する。例えば、X軸に赤蛍光強度、Y軸に側方散乱光強度をとって、図３に示すようなスキッタグラムを作成する。スキッタグラム中、少なくとも３つ、例えばリンパ球、単球および顆粒球が集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分

類計数する。その結果、リンパ球、単球および顆粒球に分類計数することができる。

さらに、工程（８）において、工程（２）で異なる種類の散乱光をさらに測定し、工程（４）で得られた幼若白血球についての該散乱光と蛍光の強度差を用いてスキヤッタグラムを作成する。例えば、X軸に赤蛍光強度、Y軸に側方散乱光強度をとって、図３に示すようなスキヤッタグラムを作成する。スキヤッタグラム中、少なくとも２つ、例えば骨髓系芽球および顆粒球系幼若球が集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分類計数する。その結果、骨髓系芽球および顆粒球系幼若球に分類計数することができる。

なお、工程（７）と工程（８）は、別々の工程として行っても、同時に行ってもよい。同時に行う際には、工程（４）において、ゴーストを除去した成分の該散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いてスキヤッタグラムを作成すると、図３に示すようなスキヤッタグラムが得られ、一度に、成熟白血球および幼若白血球をさらに複数個の集団に分類計数することができるので、好ましい。

#### 図面の簡単な説明

図１は、本発明の方法によって分類計数される各細胞の出現位置を示す概念図である。

図２は、本発明の方法によって分類計数される各細胞の出現位置を示

す概念図である。

図 3 は、本発明の方法によって分類計数される各細胞の出現位置を示す概念図である。

図 4 は、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 1 のスキヤッタグラムである。

図 5 は、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 1 のスキヤッタグラムである。

図 6 は、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 1 のスキヤッタグラムである。

10 図 7 は、本法と DNA 量標準測定法の結果を示す。

図 8 は、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

図 9 は、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

15 図 10 は、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

図 11 は、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

図 12 は、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

図 13 は、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

図 1 4 は、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 3 の反応時間 1 3 秒の場合のスキッタグラムである。

図 1 5 は、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 3 の反応時間 1 3 秒の場合のスキッタグラムである。

5 図 1 6 は、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 3 の反応時間 1 3 秒の場合のスキッタグラムである。

図 1 7 は、反応時間 1 3 秒の本発明の方法と DNA 量標準測定法の結果を示す図である。

図 1 8 は、本発明で利用できるフローサイトメータの光学系を示す斜  
10 視図である。

#### 発明の実施の形態

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明には種々の変更、修飾が可能であり、従って、本発明の範囲は以下の実施例  
15 によって限定されるものではない。

##### 実施例 1

以下の組成の水溶液からなる試薬を調製した。

##### (本法)

	ポリオキシエチレン (1 6) オレイルエーテル	24. 0g
20	N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	1. 5g
	D L-メチオニン	20. 0g
	1 N-N a O H	0. 3g

N a C l	4.0g
式 ( V I ) の色素	3.0mg
H E P E S	12.0g
精製水	1000ml

- 5 上述の試薬 1 m l とリンパ球性白血病患者の血液 3 3  $\mu$  l を混合し、  
1 0 秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光  
を測定した (光源：赤色半導体レーザー、波長：6 3 3 n m) 。

(DNA 量標準測定法)

10 クエン酸 3 N a	100mg
T r i t o n X - 1 0 0 (和光純薬工業株式会社)	0.2g
プロピジウムアイオダイド (シグマ)	0.2g
R O 水	100ml

- 上述の試薬 1 m l と上述の患者の血液 1 0 0  $\mu$  l を混合し、3 0 分後に
- 15 フローサイトメータで赤蛍光を測定した (光源：アルゴンイオンレーザ  
ー、波長：4 8 8 n m) 。得られた結果を、X 軸に前方低角散乱光幅、  
Y 軸に前方低角散乱光ピークをとったスキヤッタグラム (図 4) 、X 軸  
に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとったスキヤッタグラム (図  
5) および X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとったスキヤッ  
20 タグラム (図 6) に示す。

上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視  
を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。また、上記の

血液を用いて、フローサイトメーターによる DNA 量標準測定法にて、白血球の DNA 量を測定した。得られた結果を、表 1 および図 7 に示す。

表 1：本法と目視の結果

	本法	目視法
リンパ球 (%)	38.3	39.0
単球 (%)	4.5	3.0
顆粒球 (%)	47.7	49.0
骨髄芽球 (%)	2.3	1.5
顆粒球系幼若球 (%)	2.1	1.5
DNA 量異常白血球 (%)	5.1	6.0
成熟白血球 : DNA 量異常白血球	17.7:1	15.2:1
幼若白血球 : DNA 量異常白血球	0.86:1	0.5:1
成熟白血球 : 幼若白血球	20.6:1	30.3:1

上記の結果、本発明の方法が、DNA量異常白血球と幼若白血球を同時にかつ迅速、簡便に目視と同程度の高精度で測定することが可能であることが示された。

5

## 実施例 2

以下の組成の水溶液からなる試薬を調製した。

(本法)

10	ポリオキシエチレン (16) オレイルエーテル	24.0g
	N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	1.5g

DL-メチオニン	20.0g
1N-NaOH	0.3g
NaCl	4.0g
式(VII)の色素	3.0mg
5 HEPES	12.0g
精製水	1000ml

上述の試薬1mlと急性骨髄性白血病(AML)患者の血液33 $\mu$ lを混合し、10秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光を測定した(光源:赤色半導体レーザー、波長:633nm)

10

(DNA量標準測定法)

クエン酸3Na	100mg
TritonX-100(和光純薬工業株式会社)	0.2g
プロピジウムアイオダイド(シグマ)	0.2g
15 RO水	100ml

上述の試薬1mlと上述の患者の血液100 $\mu$ lを混合し、30分後にフローサイトメータで赤蛍光を測定した(光源:アルゴンイオンレーザー、波長:488nm)。得られた結果を、X軸に前方低角散乱光幅、Y軸に前方低角散乱光ピークをとったスキャッタグラム(図8)、X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとったスキャッタグラム(図9)およびX軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとったスキャッタグラム(図10)に示した。



上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。その結果を表2に示す。

表 2 :

	本法	目視法
リンパ球 (%)	3.6	4.0
単球 (%)	8.6	10.0
顆粒球 (%)	77.0	75.0
骨髄芽球 (%)	3.6	5.0
顆粒球系幼若球 (%)	7.2	6.0
DNA 異常白血球 (%)	0.0	0.0
成熟白血球 : DNA 量異常白血球	89.2:0	89.0:0
幼若白血球 : DNA 量異常白血球	10.8:0	11.0:0
成熟白血球 : 幼若白血球	8.26:1	8.1:1

5

上記の結果、本発明の方法が、DNA量異常白血球と幼若白血球を同時にかつ迅速、簡便、高精度に測定することが可能であることが示された。

### 10 実施例 3

実施例 1 と同様の組成の試薬を用いた。本法試薬 1 m l と骨髄異形性

症候群患者の骨髓液 33  $\mu$ l を混合し、7 秒後と 13 秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光を測定した（光源：赤色半導体レーザー、波長：633 nm）。

5 (DNA 量標準測定法)

- DNA 量標準測定法試薬 1 ml と上述の患者の骨髓液 100  $\mu$ l を混合し、30 分後にフローサイトメータで赤蛍光を測定した（光源：アルゴンイオンレーザー、波長：488 nm）。得られた結果を、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった反応時間 7 秒の場合の
- 10 スキャッタグラム（図 11）、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった反応時間 7 秒の場合のスキャッタグラム（図 12）、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった反応時間 7 秒の場合のスキャッタグラム（図 13）、X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった反応時間 13 秒の場合のスキャッタグラム（図
- 15 14）、X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった反応時間 13 秒の場合のスキャッタグラム（図 15）、X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった反応時間 13 秒の場合のスキャッタグラム（図 16）に示す。

- 上記の骨髓液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目
- 20 視を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。また、上記の血液を用いて、フローサイトメータによる DNA 量標準測定法にて、白血球の DNA 量を測定した。その結果を表 3 に示す。表 4 と図 17 に反応

時間 13 秒の本発明の方法と DNA 量標準測定法の結果を示す。

表 3 :

	本法 (反応 時間 7 秒)	目視法
リンパ球 (%)	9.5	8
単球 (%)	16.4	18
顆粒球 (%)	6.8	9
骨髓芽球 (%)	2.3	1
顆粒球系幼若球 (%)	65.0	51
DNA 量異常白血球 (%)	0	13
成熟白血球 : DNA 量異常白血球	32.7:0	2.7:1
幼若白血球 : DNA 量異常白血球	67.3:0	4:1
成熟白血球 : 幼若白血球	0.49:1	0.67:1

表 4 :

	本法 (反応時間 1 3 秒) (%)	DNA 量標準測定法 (%)
DNA 量異常白血球	11	13
正常 (DNA 量) 白血球	89	87

以上より反応時間 7 秒のときは成熟白血球、幼若白血球を正確に測定  
することができ、反応時間 1 3 秒にすることにより、さらに幼若白血球  
5 に含まれる DNA 量異常白血球を検出することができる。

上記に示したように、本発明により、DNA 量異常白血球を迅速かつ  
簡便に測定することが可能となった。

## 請求の範囲

1. (1) 血液学的試料を溶血剤で処理して得られた試料中の細胞を、  
少なくとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に
- 5 蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、  
(2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各  
細胞について、散乱光と蛍光とを測定する工程、  
(3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、同時通過細胞  
および血小板凝集と、白血球とを分類する工程、
- 10 (4) 工程(3)で分類された白血球について散乱光の強度差と蛍光の  
強度差とを利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血  
球を分類計数する工程  
からなる白血球の分類計数方法。
- 15 2. さらに、DNA量異常白血球数と成熟白血球数または幼若白血球数  
とから、DNA量異常白血球に対する成熟白血球または幼若白血球の割  
合を算出する工程からなる請求項1に記載の方法。
3. さらに、成熟白血球数と幼若白血球数とから、成熟白血球に対する
- 20 幼若白血球の割合を算出する工程からなる請求項1または2に記載の方  
法。

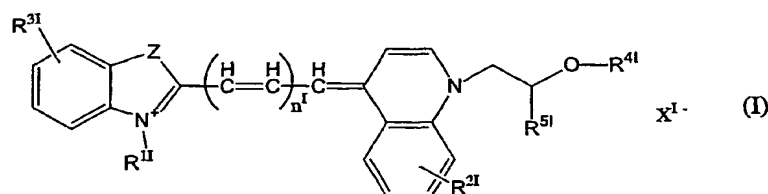
4. 工程(2)で異なる種類の散乱光をさらに測定し、さらに、工程(4)で得られた成熟白血球についての該散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、成熟白血球を少なくとも3つに分類計数する工程からなる請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

5

5. 工程(2)で異なる種類の散乱光をさらに測定し、さらに、工程(4)で得られた幼若白血球についての該散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、幼若白血球を少なくとも2つに分類計数する工程からなる請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

10

6. 蛍光色素が、式(I)：



(式中、 $R^{11}$ は水素原子または低級アルキル基； $R^{21}$ 及び $R^{31}$ は水素原子、低級アルキル基または低級アルコキシ基； $R^{41}$ は水素原子、アシル基または低級アルキル基； $R^{51}$ は水素原子または置換されてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子、または低級アルキル基で置換された炭素原子； $n^1$ は1または2； $X^1$ はアニオンである。)で表される化合物ならびにエチジウムブロマイド、プロピジウムアイオダイド、エチジウム-アクリジンヘテロダイマー、エチジウムジアジド、エチジウムホモ

ダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウムモノアジド、  
TOTO-1、TO-PRO-1、TOTO-3および  
TO-PRO-3からなる群から選択される請求項1～5のいずれか1  
つに記載の方法。

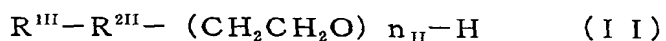
5

7. 溶血剤が以下の成分：

- (1) ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤
- (2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤
- (3) アミノ酸および

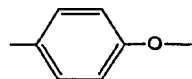
10 (4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/  
kgにする緩衝液からなる請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が、以下の式(I I)：



15 (式中、 $R^{III}$ は $C_{9-25}$ のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；

$R^{II}$ は、 $-O-$ 、

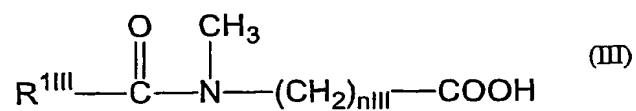


または $-COO-$ ； $n_H$ は10～40である。)で表される化合物からなる請求項1～7のいずれか1つに記載の方法。

20

9. 可溶化剤が、以下：

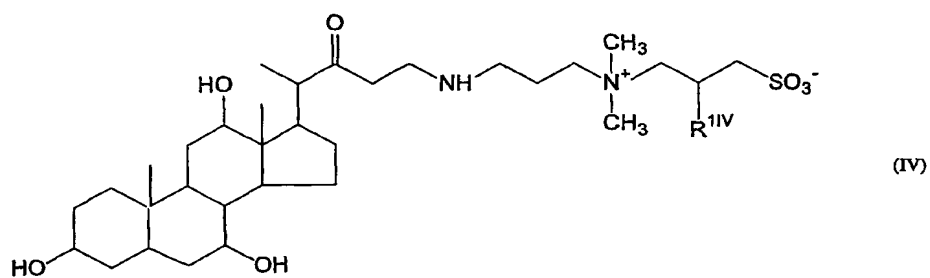
式 (III)：



(式中、 $\text{R}^{\text{III}}$ は $\text{C}_{10-22}$ のアルキル基； $n^{\text{III}}$ は1～5である。)

5 のサルコシン誘導体あるいはその塩、

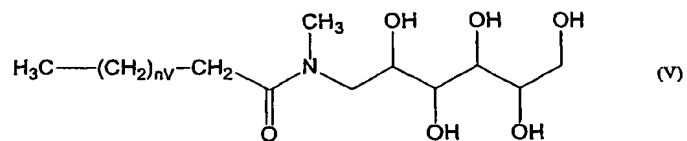
式 (IV)：



(式中、 $\text{R}^{\text{IV}}$ は水素原子または水酸基。)

10 のコール酸誘導体、および

式 (V)：



(式中、 $n^{\text{V}}$ は5～7である。)

メチルグルカンアミドからなる群から選択される1つ以上の化合物であ

15 る請求項1～8のいずれか1つに記載の方法。



10. 測定する散乱光が、前方低角散乱光、前方高角散乱光および側方散乱光から選ばれる少なくとも2つである請求項1～9のいずれか1つに記載の方法。
- 5 11. 血液学的試料を溶血剤と混合する工程および得られた混合物中の細胞を少なくとも成熟白血球、DNA異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程によって調製された測定試料を通過させるオリフィス部と、オリフィス部に光を照射する光源と、オリフィス部から発せられた散乱光を受光する第1受光部
- 10 と、オリフィス部から発せられた蛍光を受光する第2受光部とを備えたフローサイトメータと、
- 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、同時通過細胞および血小板凝集と、白血球とを分類する工程および分類された細胞の強度差と蛍光の強度差とを利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および
- 15 幼若白血球を分類計数する工程により測定試料を解析する解析部を備えた白血球の分類計測装置。

図 1

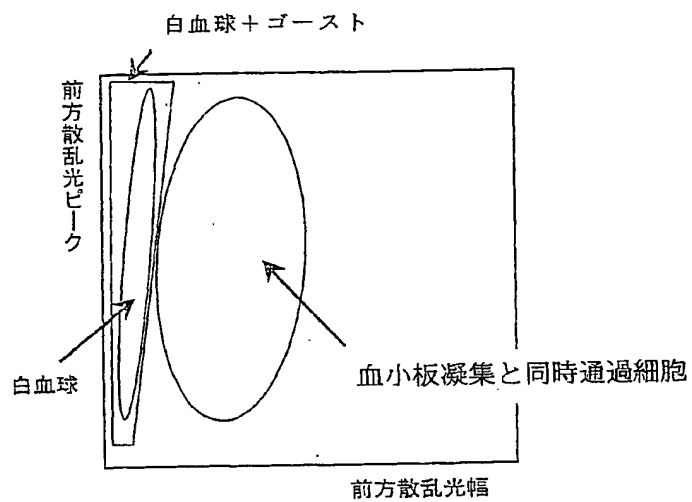


図 2

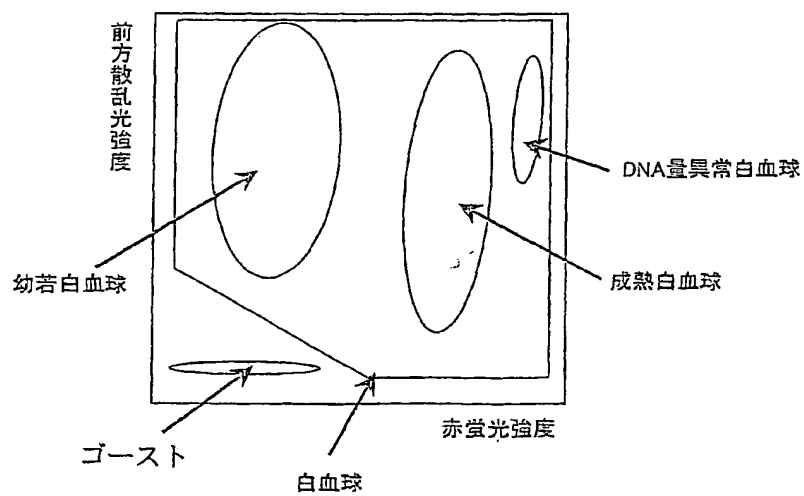


図 3

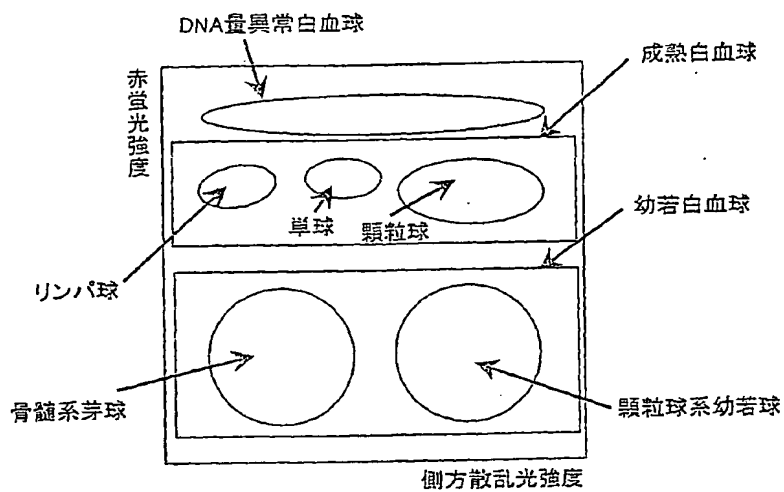


図 4

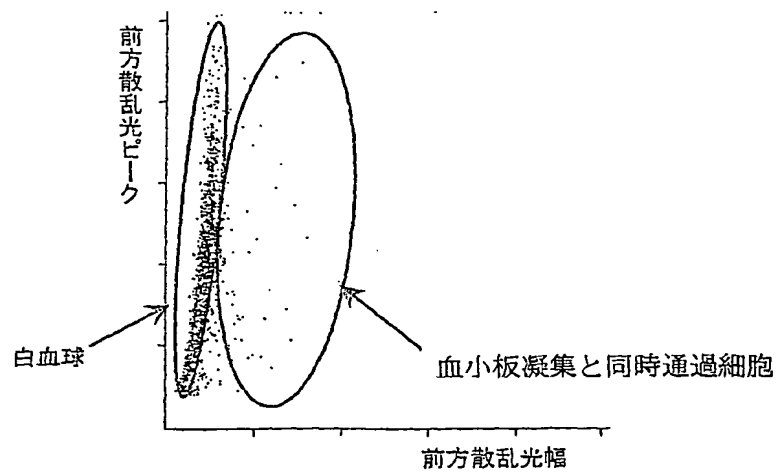


図 5

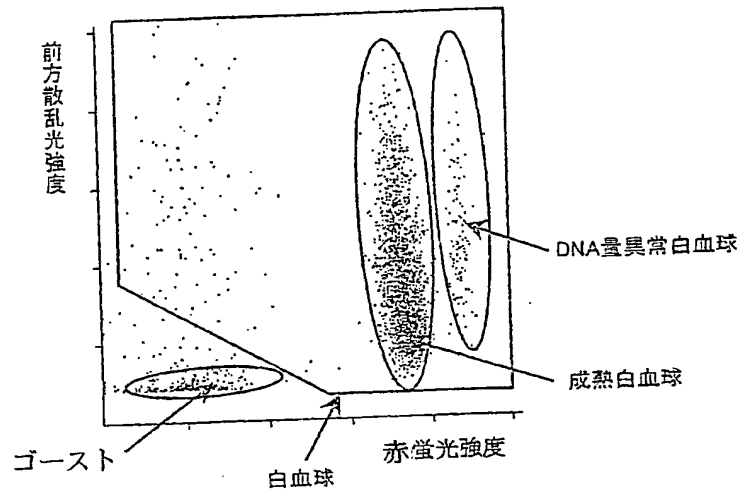


図 6

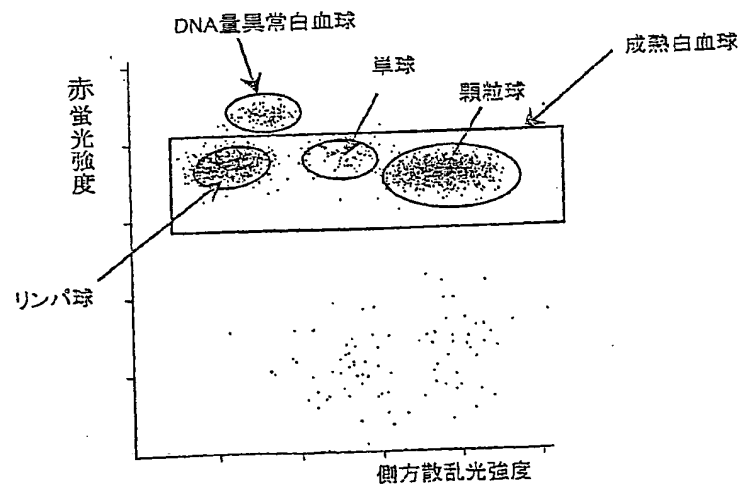


図 7

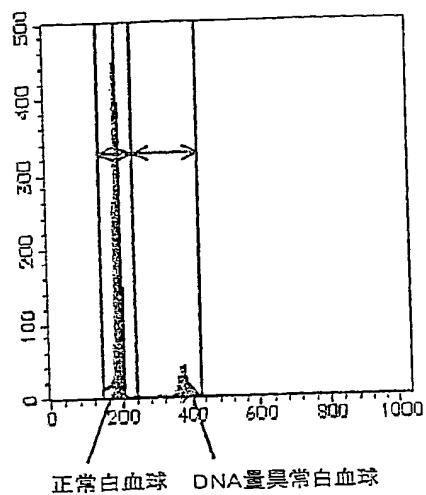


図 8

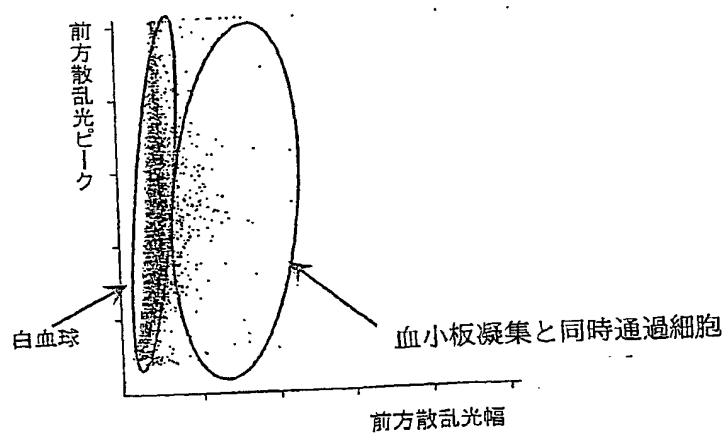


図 9

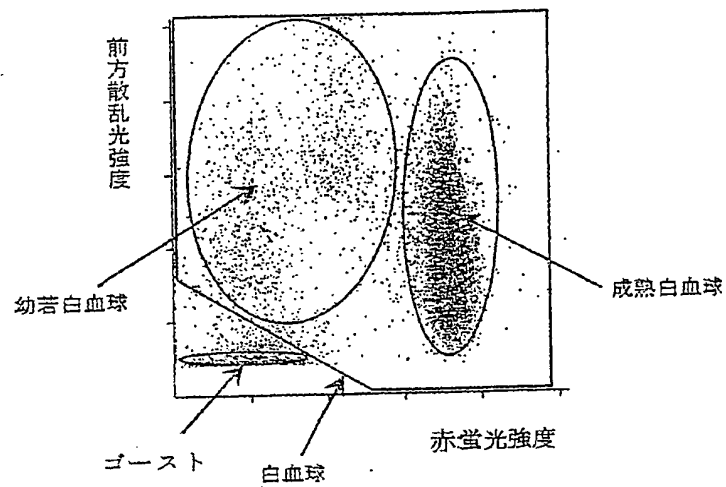


図 10

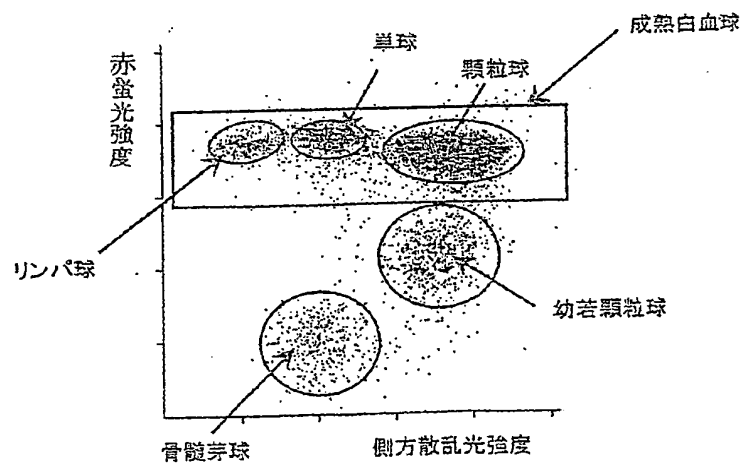


図 1 1

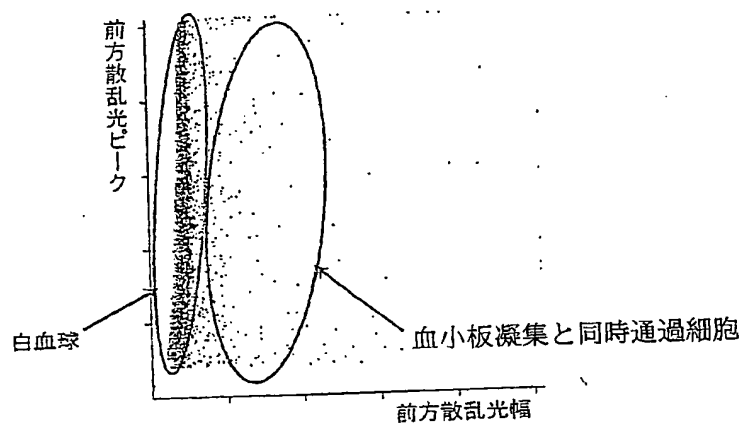


図 1 2

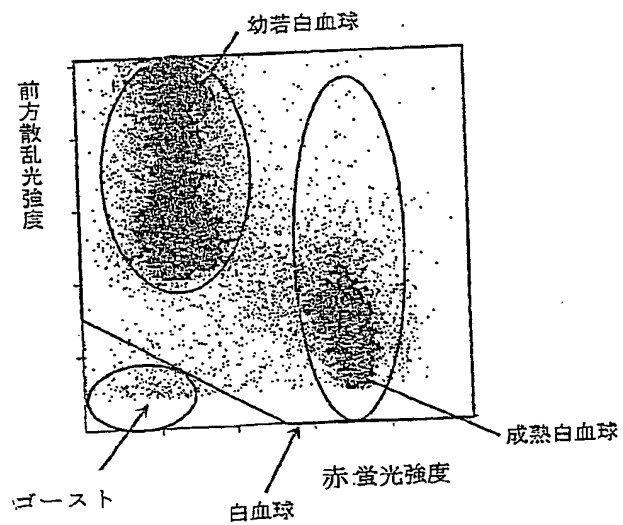


図 1 3

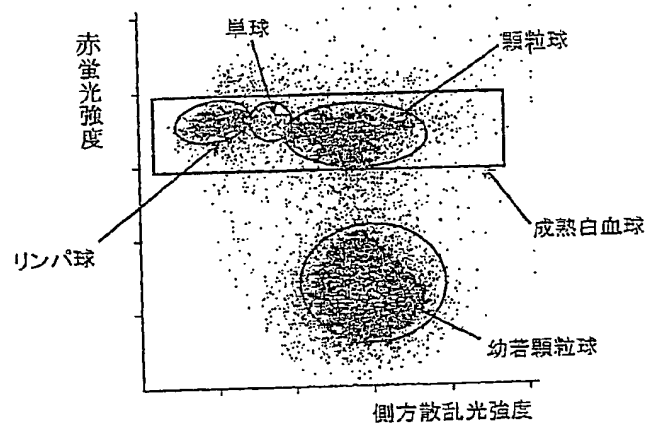


図 1 4

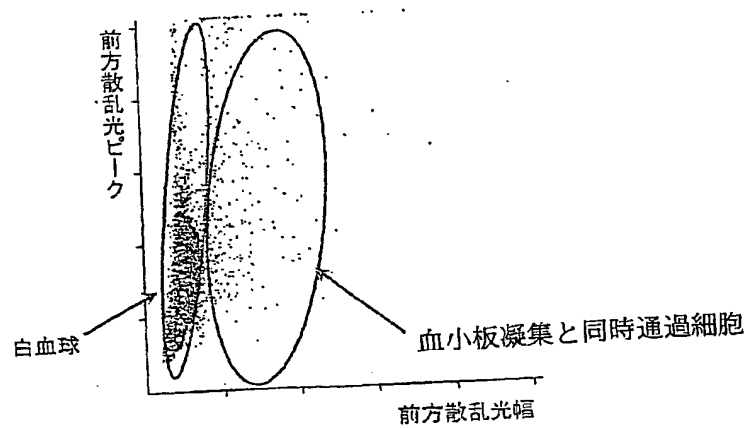




図 1 5

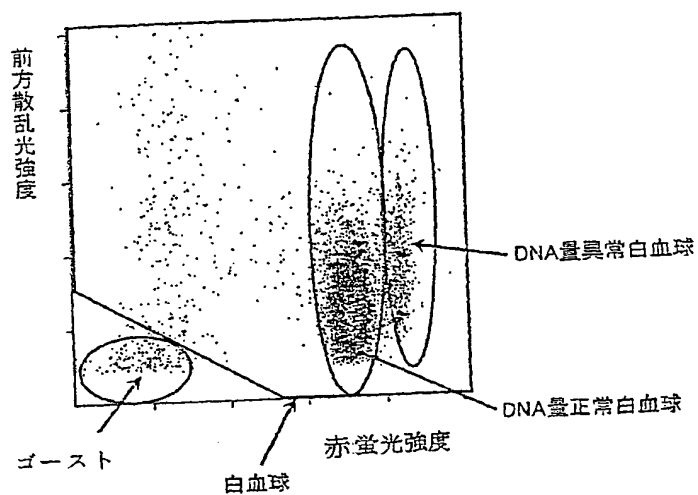


図 1 6

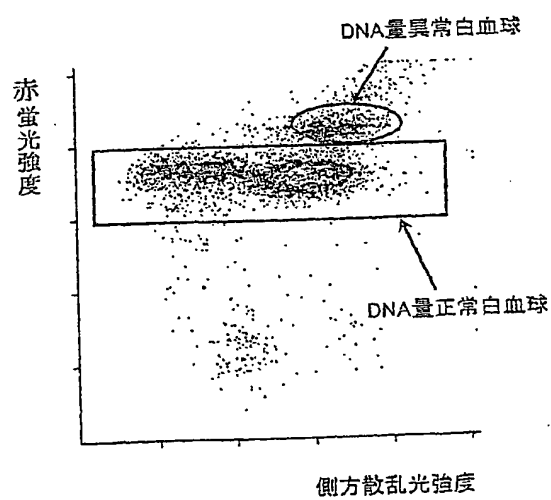


図 17

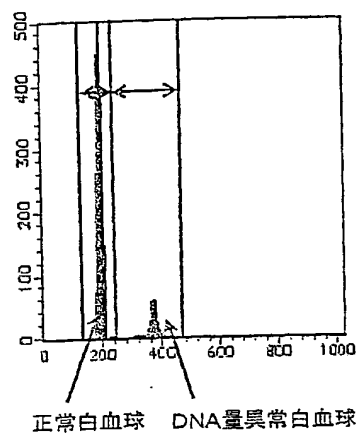
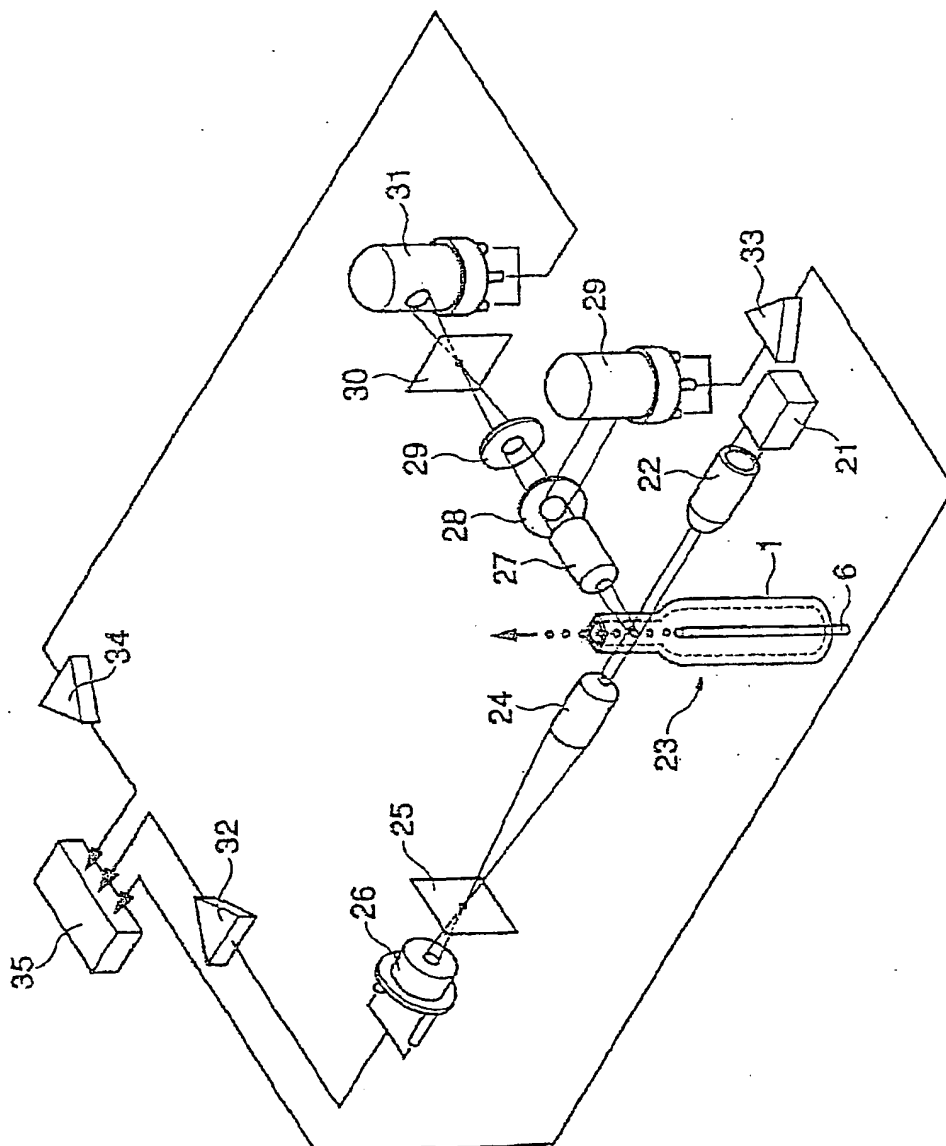


図 18



mm	mm	pp	ppp	eeee	rr	rrr	sssss	oooo	nnnnn		
mmmmmmmm	pp	pp	ee	ee	rrr	rr	ss	oo	oo	nn	nn
mmmmmmmm	pp	pp	eeeeee		rr	rr	ssss	oo	oo	nn	nn
mm	m	mm	ppppp	ee	rr		ss	oo	oo	nn	nn
mm	mm	pp	eeee		rrrr		sssss	oooo		nn	nn
		pppp									

666	8888	555555
66	88 88	55
66	88 88	55555
66666	8888	55
66 66	88 88	55
66 66	88 88	55 55
6666	8888	5555

6/9/05